



REC'D 14 JUL 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**DOCUMENT DE PRIORITÉ****U9/980265****PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **19 JUIN 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A stylized, handwritten signature in black ink, appearing to read 'M+Planche'.

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES - 8 JUIN 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9907457 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 4 DATE DE DÉPÔT 08 JUIN 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE KERNEIS Danièle Direction de la Propriété Intellectuelle PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins 58, Avenue Leclerc 69007 LYON n° du pouvoir permanent PG 04853 références du correspondant PM9905 téléphone 04.37.37.70.90	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT		3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 4 9 5 0 5 3 7 0 code APE-NAF 2 4 4 C Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins Nationalité (s) FRANÇAISE Adresse (s) complète (s) 58, Avenue Leclerc F - 69007 LYON En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée		5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission	
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) KERNEIS Danièle Ingénieur Propriété Intellectuelle		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION : SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI M. PUEZ	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9907457

TITRE DE L'INVENTION :

OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BACHY Monique
Domaine de la Roche
F - 69440 SAINT MAURICE / DARGOIRE

SODOYER Régis
La Calmeraie
5, rue du Brulet
F - 69110 SAINTE FOY LES LYON

TRANNOY Emmanuelle
4, rue Pauline Marie Jaricot
F - 69005 LYON

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

8 juin 1999



KERNEIS Danièle

OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

La présente invention est relative au domaine des immunostimulants. Plus particulièrement, l'invention concerne des oligonucléotides capables de stimuler
5 des cellules humaines intervenant dans le système immunitaire, et à leur utilisation comme adjuvant vaccinal.

Un grand nombre d'oligonucléotides ont déjà été décrits dans l'art antérieur, en relation avec leurs propriétés immunostimulantes. Ainsi, la demande
10 EP 0 468 520 décrit des polynucléotides immunostimulants constitués par un simple brin d'ADN linéaire comprenant de 10 à 100 nucléotides s'enchaînant selon une séquence palindromique.

Selon la demande WO 96/02 555, l'activité immunostimulatrice d'oligonucléotides
15 est liée à la présence d'une séquence dinucléotique 5' CG 3', dans laquelle ni C ni G ne sont méthylés, l'activité immunostimulante étant plus forte si le motif CG est précédé en 5' du dinucléotide GA et / ou suivi en 3' du dinucléotide TC ou encore TT.

20 Au contraire, selon la demande de brevet WO 98/52 962, il n'est pas nécessaire que la séquence de l'oligonucléotide soit un palindrome, ni qu'elle comprenne le dinucléotide CG ; en effet, les 3 nucléotides décrits dans cette demande pour une utilisation en tant qu'adjuvant vaccinal ont les séquences suivantes :

5'GACGTT3',

25 5'GAGCTT3', ainsi que

5' TCCGGA 3'.

Selon le brevet US 5,663,153, l'activité immunostimulante d'oligonucléotides n'est pas liée à la séquence des nucléotides, mais à la nature de la liaison entre
30 nucléotides, la présence d'au moins une liaison phosphorothioate permettant d'induire une stimulation du système immunitaire.

La plupart des tests de l'art antérieur pour évaluer l'activité immunostimulante des oligonucléotides proposés, sont effectués soit in vitro sur des cellules animales (essentiellement des cellules murines), soit in vivo sur des souris. Cependant, les différences existant entre le système immunitaire de la souris et celui de l'être humain, ont conduit à des différences entre les résultats obtenus sur des cellules murines et ceux obtenus sur des cellules humaines.

Or l'industrie pharmaceutique a un grand besoin d'immunostimulants pouvant être administrés à l'homme, notamment dans le domaine des vaccins.

La présente invention a donc pour but de proposer des oligonucléotides capables de stimuler des cellules du système immunitaire de l'être humain.

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la Thymine, et N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C n'est pas méthylée.

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend de 6 à 100 nucléotides.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD86 des lymphocytes B humains.

L'invention a également pour objet un adjuvant vaccinal caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence

5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide étant dépourvu de séquence dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

5

L'invention a également pour objet une composition vaccinale à usage humain comprenant au moins un antigène vaccinal caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide étant dépourvu de séquence dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

15 La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, en référence aux figures 1 à 6 qui illustrent les résultats obtenus lors des tests décrits aux exemples 2 et 3.

Par oligonucléotide au sens de la présente invention, on entend un polynucléotide comprenant au moins 6 nucléotides. En effet, contrairement à l'enseignement de l'article intitulé "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation", Krieg et al., Nature 1995, on a remarqué qu'il n'était pas nécessaire que l'oligonucléotide ait au moins 8 nucléotides. Par contre, la limite supérieure de la taille des oligonucléotides n'est pas vraiment déterminée. On peut cependant noter que ,plus l'oligonucléotide sera long, plus sa purification sera difficile à effectuer lors des étapes de synthèse , et plus le prix de revient en sera élevé. D'autre part, il est probable qu'un oligonucléotide de grande longueur aura plus de difficultés à pénétrer dans les cellules. Aussi, pour les besoins de la présente invention, on considère qu'une limitation de la taille de l'oligonucléotide à 100 nucléotides est appropriée. Cet oligonucléotide est de préférence un oligonucléotide simple brin ; il peut s'agir d'un oligodésoxyribonucléotide ou d'un oligoribonucléotide. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un oligodésoxyribonucléotide. Les

oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester ou, afin d'être plus stables, sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester / phosphorothioates. Les oligonucléotides phosphorothioates sont ceux préférés.

5

L'oligonucléotide selon l'invention est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire. Cette stimulation est appréciée notamment par la lymphoprolifération ou par l'expression de marqueurs d'activation, tels que les marqueurs CD25 et CD86 des lymphocytes B. Il est possible de
10 sélectionner les oligonucléotides d'intérêt au moyen de tests différents de ceux proposés dans la présente demande, à condition cependant qu'il s'agisse de tests évaluant la capacité de stimulation de cellules humaines, et non pas comme dans la plupart des documents de l'art antérieur, de tests évaluant la capacité de la stimulation de cellules murines. Il serait notamment possible de
15 tester l'expression d'autres marqueurs d'activation des lymphocytes B tels que les marqueurs CD69 ou CD56, ou l'expression de marqueurs de prolifération tels que le marqueur KI67; des tests relatifs à l'augmentation des marqueurs d'activation et de maturation des cellules dendritiques pourraient également être utilisés. De même, des tests permettant l'appréciation de l'augmentation
20 de production de certaines cytokines telles que par exemple IL6, IL12, IL10, IFN γ , TNF α . peuvent également être utilisés.

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend au moins une séquence nucléotidique 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine
25 et, N₁ et N₂ peuvent représenter chacun l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine. Cette formule couvre ainsi 16 possibilités. Cette séquence peut être 5' terminale, 3' terminale ou être entourée par d'autres nucléotides. Elle peut être unique ou répétée plusieurs fois à l'identique à l'intérieur d'un même oligonucléotide. Un oligonucléotide selon l'invention peut également
30 comprendre plusieurs séquences différentes correspondant chacune au motif 5' T T N₁ N₂ T T 3'.

Selon l'invention, l'oligonucléotide ne comporte pas de séquence palindromique. Malgré cette absence de séquence palindromique, un tel oligonucléotide est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire.

5

Selon une caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine n'est pas méthylée. Cette exclusion s'applique également au motif N_1N_2 . La capacité des oligonucléotides de l'art antérieur à être immunostimulants a presque toujours été interprétée comme
10 liée à la présence de motifs CpG non méthylés (Cf. notamment l'article de Krieg et al dans Nature d'avril 1995 cité ci-dessus), cette interprétation étant en cohérence avec l'observation selon laquelle la fréquence de ce dinucléotide était 4 fois plus importante dans le génome des bactéries et des virus que dans celui des vertébrés. De façon surprenante, on a maintenant trouvé que des
15 oligonucléotides entièrement dépourvus de ce motif dinucléotidique étaient cependant parfaitement capables de stimuler le système immunitaire humain.

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu ou appauvri en séquence nucléotidique capable d'inhiber les cellules
20 du système immunitaire humain. En effet, afin d'obtenir un effet global immunostimulant, si des motifs inhibiteurs ou neutralisants tels que, par exemple, ceux décrits dans la demande WO 98/52 581 sont présents, il faut que leur effet soit supprimé ou réduit, grâce à la présence d'une séquence à effet immunostimulant plus prononcé, ou grâce à la présence d'un plus grand
25 nombre de séquences 5' T T N_1 N_2 T T 3'.

La présente invention a également pour objet un adjuvant vaccinal comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant au moins un motif 5' T T N_1 N_2 T T 3' tel que mentionné ci-dessus. Par adjuvant vaccinal, on
30 entend un produit qui permet d'accroître ou de modifier la réponse du système immunitaire d'un organisme vis à vis de l'administration d'un antigène. En particulier, il peut s'agir d'une augmentation de la réponse humorale ou de la réponse cellulaire.

L'action d'un adjuvant vaccinal peut également être, non pas une augmentation de la réponse qui se produirait en l'absence d'adjuvant, mais une orientation différente de la réponse produite : par exemple, orientation vers une réponse cellulaire plutôt qu'une réponse humorale, production de certaines cytokines
5 plutôt que d'autres, production de certains types ou sous-types d'anticorps plutôt que d'autres, stimulation de certaines cellules plutôt que d'autres, etc...

L'oligonucléotide immunostimulant de la présente invention peut être utilisé comme adjuvant vaccinal quelle que soit la nature de l'antigène administré et
10 quel que soit le nombre de valences utilisées. Il peut être le seul adjuvant utilisé ou, au contraire, être un élément d'une combinaison adjuvante.

L'action adjuvante de l'oligonucléotide selon l'invention peut être obtenue, soit lorsqu'il est associé à l'antigène ou aux antigènes lors de leur administration, i.e. lorsqu'ils font partie de la même composition vaccinale, soit lorsqu'il est
15 administré séparément de l'antigène ou des antigènes. On préfère cependant l'utiliser dans la même composition vaccinale que l'antigène ou les antigènes à administrer.

L'oligonucléotide selon l'invention peut avantageusement être administré par toutes les voies susceptibles d'être utilisées pour une composition vaccinale
20 :voie muqueuse ou voie systémique.

L'un des objets de l'invention est une composition vaccinale comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant une séquence
25 5' T T N₁N₂ T T 3' telle que décrite ci-dessus.

Une composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à l'immunisation contre une seule maladie, ou destinée à l'immunisation contre plusieurs maladies. Il peut s'agir d'une composition vaccinale liquide ou lyophilisée. Elle peut comprendre, outre les antigènes, tout ou partie des composants
30 habituellement présents dans un vaccin : tampons, stabilisants, conservateurs, ... Elle peut également comprendre un ou plusieurs adjuvant(s) autre(s) que ceux objets de la présente invention. Elle peut également comprendre plusieurs adjuvants objets de la présente invention, constitués soit par des

oligonucléotides ayant tous le même motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' mais se différenciant par les nucléotides en 5' et/ou en 3', soit par des oligonucléotides ayant des motifs 5' T T N₁ N₂ T T 3' différents, dont les séquences en 5' et en 3' sont identiques ou différentes.

5

La composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à une administration prophylactique ou à une administration thérapeutique.

10 La composition vaccinale selon l'invention peut être formulée de manière à optimiser l'action adjuvante de l'oligonucléotide objet de l'invention. Ainsi, l'oligonucléotide peut être couplé à un lipide, tel que le cholestérol ; il peut être intégré dans une émulsion de type huile / eau ou formulé sous forme de liposomes.

15 Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

Exemple 1 :

20

Synthèse des oligonucléotides

On synthétise 15 oligonucléotides ayant chacun un des motifs suivants :

5' TTAATT 3'	}	Série A
5' TTACTT 3'		
5' TTATTT 3'		
5' TTAGTT 3'		
5' TTTTTT 3'	}	Série T
5' TTTATT 3'		
5' TTTCTT 3'		
5' TTTGTT 3'		

5' TTCCTT 3'
5' TTCATT 3'
5' TTC TTT 3' } Série C

5' TTGGTT 3'
5' TTGATT 3'
5' TTG TTT 3'
5' TTGCTT 3' } Série G

Et ayant 4 Adénine en 5' et 5 Adénine en 3'.

La synthèse de ces oligonucléotides est réalisée au moyen d'un automate
5 synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode
chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une
étape d'oxydation, qui est réalisée au moyen d'une solution tétraéthylthiuram /
acétonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate.

10 On prépare en outre, de la même façon, un oligonucléotide A15(S) qui ne
comprend que des A et qui est phosphorothioate sur toute sa longueur. Cet
oligonucléotide est un témoin négatif car il n'entraîne ni prolifération ni
augmentation de l'expression des marqueurs d'activation des lymphocytes B.

15 On prépare également un oligonucléotide 3Db(S) dont la séquence est décrite
dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID
N°15 (5'GAGAACGCTCGACCTTCGAT3'); cet oligonucléotide comporte des
liaisons phosphorothioates sur toute sa longueur et est utilisé comme témoin
positif.

20

Tous les oligonucléotides sont maintenus en solution dans du tampon PBS.

Exemple 2 :

Test de Lymphoprolifération

- 5 On isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces lymphocytes sont ajustés à $2 \cdot 10^6$ cellules / ml dans du milieu de culture (RPMI 1640 + 10% de Sérum de Veau Foetal ainsi que de la Glutamine, de la Streptomycine et de la Pénicilline).
- 10 Les cellules sont distribuées en plaques 96 puits (fond rond) sous 100 μ l, soit $2 \cdot 10^5$ cellules par puits. On ajoute ensuite 100 μ l d'une solution 4 μ M d'oligonucléotides à tester produites à l'exemple 1 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin d'obtenir une concentration finale 2 μ M.
- 15 Les cellules sont incubées pendant 48 à 72 heures.
- La Thymidine tritiée (Amersham TRK 120) est diluée dans du milieu de culture puis distribuée dans les plaques à raison de 1 μ Ci par puits sous 50 μ l. Après
- 20 7 à 8 heures d'incubation à l'étuve (5% CO₂, 37°C), les plaques peuvent être congelées à -80°C et traitées plus tard.
- A l'aide du "Harvester", on récolte le contenu des puits sur des plaques Unifilter GF/C et on réalise 6 lavages en eau distillée puis un lavage en éthanol 70% afin de précipiter l'ADN.
- 25 Après séchage des plaques, 25 μ l de liquide scintillant (Microscint-40, Packard) sont distribués dans chaque puits et permettent de quantifier la radioactivité (rayonnements émis par le tritium) en mesurant le nombre de coups / minute (cpm) émis par chaque puits sur le compteur Top Count (Packard).
- 30 Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur les figures 1 et 2, qui indiquent, pour chaque oligonucléotide testé le nombre de coups par minute; on remarque que tous les oligonucléotides selon l'invention ont un résultat nettement supérieur au résultat obtenu avec le milieu

seul ou le témoin négatif A15(S), ce qui signifie qu'ils sont tous capables de stimuler la prolifération des lymphocytes.

5 Exemple 3 :

Test relatif aux marqueurs d'activation

Le test est effectué à partir de lymphocytes isolés d'un donneur comme décrit à
10 l'exemple précédent, et ajustés à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans le même milieu de culture.

Les cellules sont ensuite distribuées en plaques 12 puits sous un volume de 2 ml, soit $4 \cdot 10^6$ cellules / puits. On ajoute dans chaque puits une quantité
15 d'oligonucléotides à tester préparées à l'exemple 1 (1 oligonucléotide / puits) suffisante pour obtenir une concentration en oligonucléotide 2 μ M. Puis les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite doublement marquées au moyen de CD25PE / CD20FITC ou CD86PE / CD20FITC puis analysées sur FACScan. Les résultats obtenus sont illustrés
20 sur les figures 3, 4, 5 et 6 qui représentent pour chaque oligonucléotide testé, le pourcentage de cellules B (CD20+) qui expriment le marqueur CD25 (celles qui sont CD25+) ou le marqueur CD86 (celles qui sont CD86+). Les résultats représentés sur les figures 3 et 4 ont été obtenus lors d'un test réalisé à un moment différent du test dont les résultats sont illustrés sur les figures 5 et 6, ce
25 qui explique la différence d'ordre de grandeur du nombre de coups par minute mesuré. En effet, dans ce genre de manipulations, les tests sont très variables d'un dosage à l'autre, seule la comparaison des différents résultats obtenus lors d'un même test sont comparables entre eux, d'où la nécessité d'inclure lors de chaque test, un oligonucléotide-témoin ainsi qu'un dosage du milieu seul.

30

On remarque que tous les oligonucléotides objets de l'invention activent les lymphocytes B qui expriment leur marqueur d'activation CD25 et CD86.

Revendications

1. Oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système
5 immunitaire, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence
nucléotidique ayant la formule suivante 5' T T N₁ N₂ T T 3', dans laquelle T
signifie Thymine, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la
Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de
dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C n'est pas méthylée.
10
2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend
de 6 à 100 nucléotides.
3. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en
15 ce qu'il est capable d'induire la prolifération des lymphocytes B humains.
4. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en
ce qu'il est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation
CD25 et CD86 des lymphocytes B humains.
20
5. Adjuvant vaccinal caractérisé en ce qu'il comprend au moins un
oligonucléotide selon une des revendications 1 à 4.
6. Composition vaccinale à usage humain, comprenant au moins un antigène
25 vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un
oligonucléotide selon une des revendications 1 à 4.

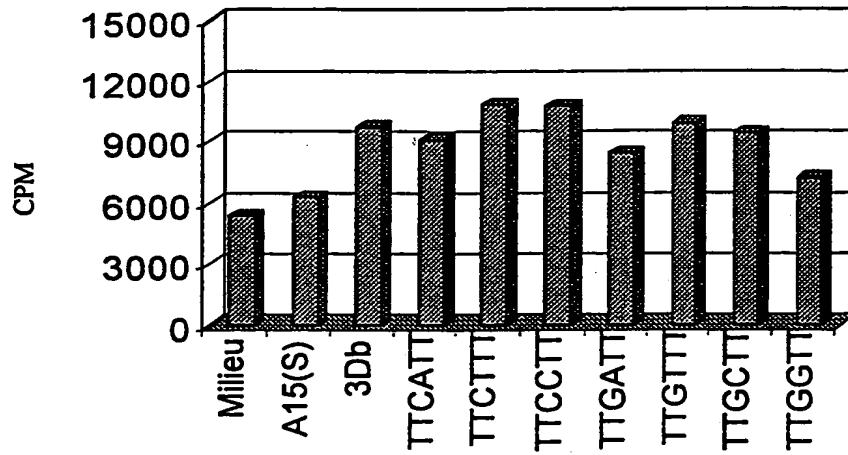


Figure 1

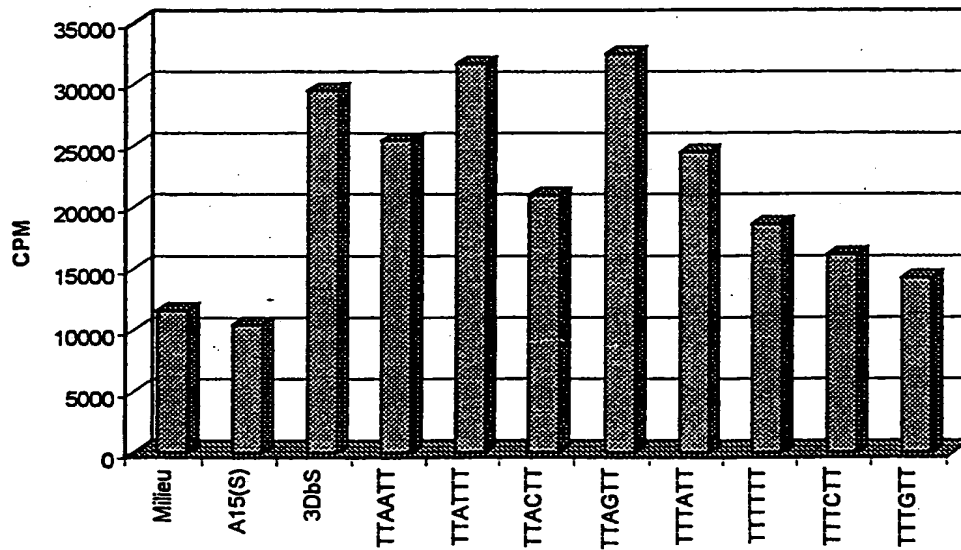


Figure 2

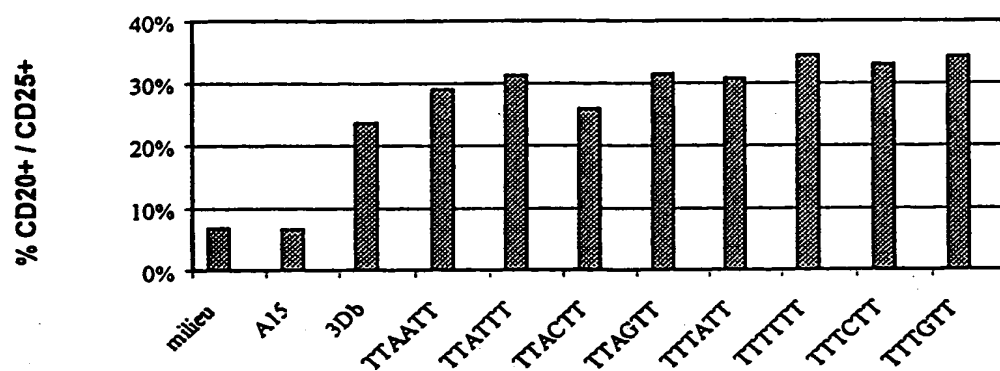


Figure 3

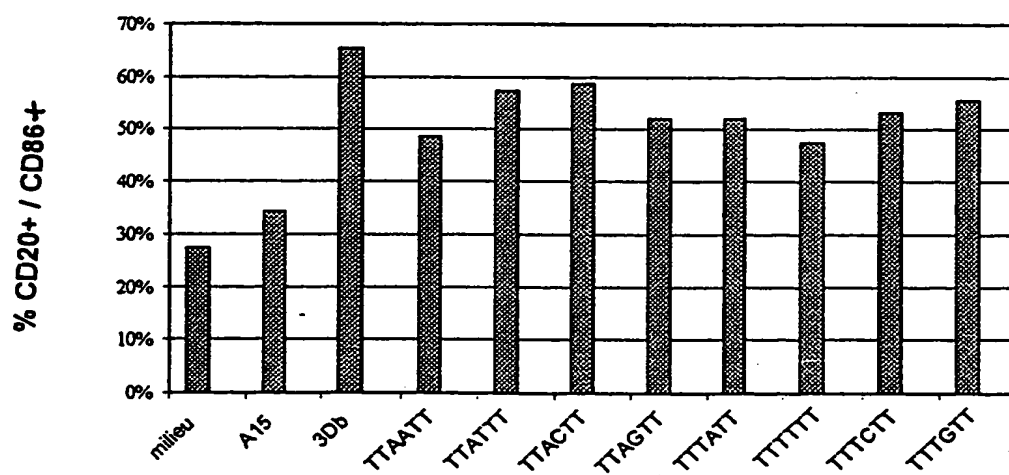


Figure 4

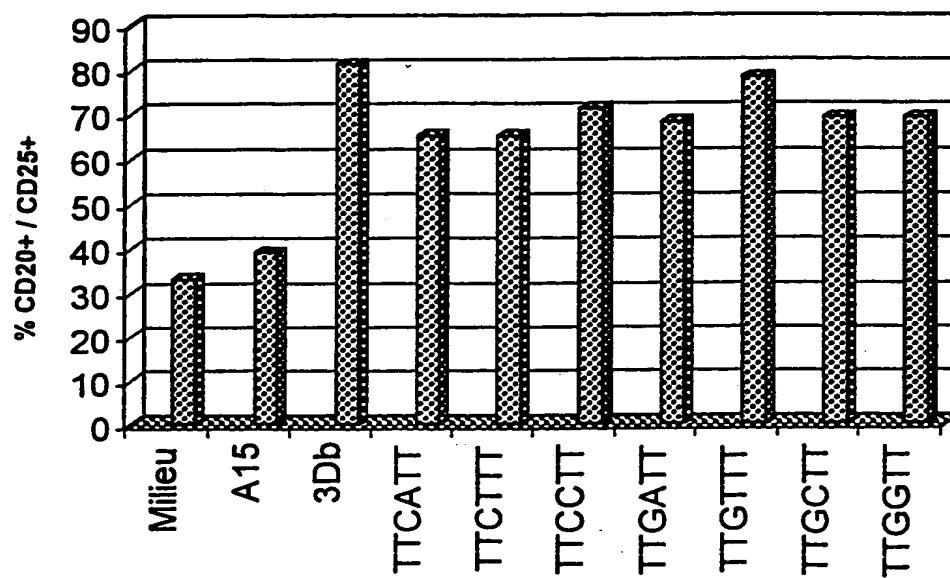


Figure 5

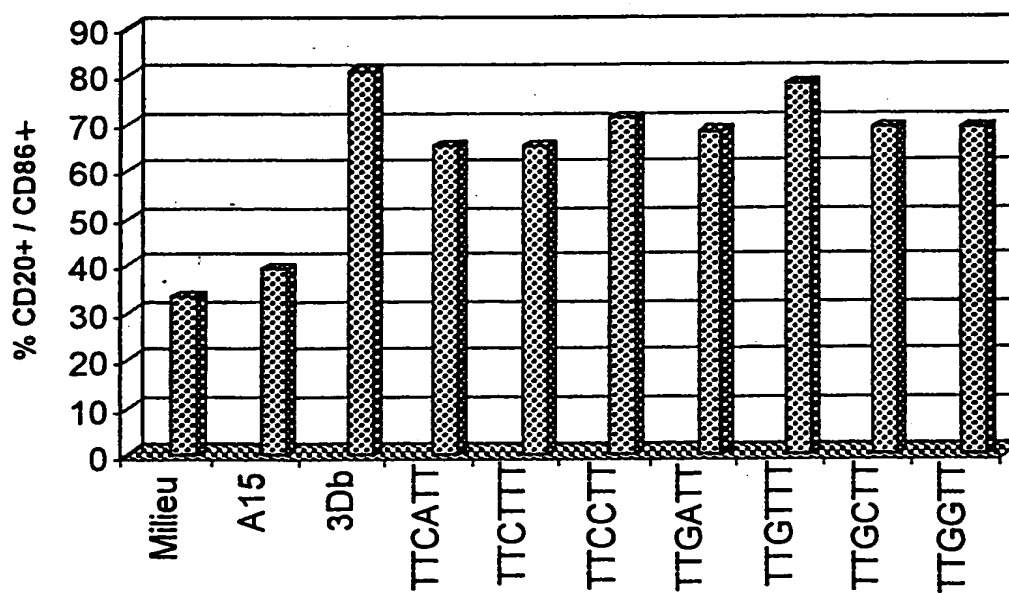


Figure 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

14 December 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) International publication number

WO 00/73504 A1

(51) International patent classification⁷: C12N 15/11, A61K 39/39, 31/7125, C07H 21/04 // A61K 45/00, A61P 37/04

(21) International application number: PCT/FR00/01566

(22) International filing date: 8 June 2000 (08.06.2000)

(25) Language of filing: French

(26) Language of publication: French

(30) Data relating to the priority:

99/07,457 8 June 1999 (08.06.1999)

99/10,378 6 August 1999 (06.08.1999)

FR

FR

(71) Applicant (for all designated States except US):

AVENTIS PASTEUR [FR/FR]; 2, avenue pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): BACHY, Monique [FR/FR]; Domaine de la Roche, F-69440 Saint Maurice sur Dargoire (FR). SODOYER, Régis [FR/FR]; La Calmeraie, 5, rue du Brulet, F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR). TRANNOY, Emmanuelle [FR/FR]; 26 C, rue des Soeurs Bouvier, F-69005 Lyon (FR).

(74) Representative: KERNEIS, Danièle; Direction de la Propriété Intellectuelle, Aventis Pasteur, 2, avenue Pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(81) Designated states (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated states (regional): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- With the International Search Report.
- Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

As printed

THIS PAGE BLANK (USPTO)